



# Indolo-Phakelline als $\beta$ 5-spezifische nichtkovalente Proteasom-Inhibitoren\*\*

Philipp Beck, Theresa A. Lansdell, Nicole M. Hewlett, Jetze J. Tepe\* und Michael Groll\*

**Abstract:** Das Proteasom ist ein etabliertes Angriffsziel zur Behandlung von Krebs und Autoimmunerkrankungen. Die Anwendung von Proteasominhibitoren ist jedoch auf Blutkrebs beschränkt, da ihre peptidischen Grundgerüste und reaktiven Kopfgruppen ungünstige pharmakodynamische Eigenschaften mit sich bringen. Die Entdeckung neuer Leitstrukturen ist somit von grundlegender Bedeutung. Hier stellen wir die erste Kristallstruktur des Proteasoms im Komplex mit einem Indolo-Phakellin vor, das sich strukturell von allen bisherigen Inhibitoren signifikant unterscheidet und einen einzigartigen, nichtkovalenten Bindemodus aufweist. Das pentacyclische Alkaloid bindet ausschließlich und spezifisch in die S3-sub-Tasche des proteasomalen  $\beta$ 5-Substratbindenkanals und wird durch eine Halogenbrücke mit dem Proteinrückgrat stabilisiert. Der Ligand bietet ein ideales Grundgerüst für die strukturbasierte Entwicklung von Untereinheitenspezifischen nichtpeptidischen Proteasomhemmstoffen.

Die Marktzulassung von Bortezomib (BTZ, Velcade) und Carfilzomib (CFZ, Kyprolis) hat das 20S-Proteasom-Kernpartikel („core particle“; CP) als Angriffsziel für die Behandlung des Multiplen Myeloms und Mantellzelllymphoms etabliert (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).<sup>[1,2]</sup> Beide Inhibitoren tragen eine elektrophile Kopfgruppe für die kovalente Bindung an das katalytisch aktive Thr1 der Protease.<sup>[3,4]</sup> Der Übergang von der promiskuitiven Boronsäure von BTZ zur CP-spezifischen  $\alpha'$ , $\beta'$ -Epoxyketon-Kopfgruppe in CFZ stellt einen Fortschritt zu besserer Selektivität mit weniger Nebenwirkungen dar.<sup>[2]</sup> Die nächste Generation der Proteasomblocker steht im Fokus der selektiven Hemmung des konstitutiven CPs (cCP) und gewebe-spezifischer Subtypen, die besondere Rollen bei Autoimmun- und Entzündungserkrankungen (Immunproteasom, iCP)

sowie der T-Zelldifferenzierung im Thymus spielen (Thymoproteasom, tCP).<sup>[5-8]</sup>

Die drei CP-Subtypen haben unterschiedliche Schnittpräferenzen, die durch die Spezifitätstaschen S1-S4 des Substratbindenkanals festgelegt sind (siehe Abbildung S2). Um eine möglichst hohe CP-Subtypspezifität zu erreichen, müssen CP-Inhibitoren entsprechend abgestimmte Reste P1-P4 aufweisen.<sup>[9]</sup> Die Entwicklung neuer CP-Liganden für die gezielte Adressierung der Bindetaschen ist jedoch auf Liganden mit peptidischem Grundgerüst begrenzt, da kaum Strukturinformationen über nichtpeptidische Wechselwirkungen verfügbar sind.<sup>[10]</sup>

Auf der Suche nach Proteasominhibitoren mit neuartigem Bindemodus untersuchten wir Verbindungen aus der mannigfaltigen Familie der biologisch aktiven marinen Pyrrolimidazolin-Alkaloide, die sich strukturell signifikant von bekannten CP-Liganden unterscheiden (Schema 1). Der bedeutendste Vertreter dieser Verbindungsklasse ist Palau'amin (1), ein zytotoxisches und immunsuppressives hexacyclisches Bisguanidin, das aus dem Meeresschwamm *Stylorella agminata* isoliert wurde.<sup>[11-13]</sup> 1 wurde als irreversibler CP-Hemmstoff beschrieben ( $IC_{50}(\beta 5c) = 2.5 \mu M$ ), jedoch ist die Synthese potenter Derivate durch das begrenzte Vorkommen und die komplexe Struktur nur eingeschränkt möglich.<sup>[14]</sup> Die strukturell verwandten Naturstoffe Dibromphakellstatin (2) und Dibromphakellin (3) sind synthetisch besser zugänglich, sie inhibieren das CP aber weniger stark als 1 ( $IC_{50}(\beta 5c) = 25.3$  bzw.  $11.9 \mu M$ ).<sup>[14,15]</sup>

Daher etablierten wir zunächst eine robuste Syntheseroute für Phakellin-Derivate, die dasselbe starre cyclische Grundgerüst und vergleichbare Hemmwirkung wie 1 aufwiesen.<sup>[14,16]</sup> Der vielversprechendste Kandidat war das bromierte Indolo-Phakellin 4, das ähnlich wie Dibromphakellin und 5 über eine N-Bromsuccinimid-vermittelte Addition von Boc-Guanidin an die olefinische Vorstufe 7 hergestellt wird (Schema 2).<sup>[14]</sup> Entfernen der Boc-Schutzgruppe mit 5% Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (DCM) ergab den bromierten Liganden 4 in 94% Ausbeute.

Die Verbindung inhibierte die  $\beta$ 5-Aktivität von humanem cCP mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $3.5 \mu M$  (Schema 1c). Im Zuge dieser aussichtsreichen Ergebnisse wurde eine Kristallstruktur des yCP:4-Komplexes mit einer Auflösung von  $2.5 \text{ \AA}$  bestimmt ( $R_{\text{frei}} = 21.6\%$ ; PDB-ID: 4RUR, siehe Tabelle ST1). Überraschenderweise zeigte die  $F_o - F_c$ -Elektronendichte den Liganden 4 ausschließlich und wohldefiniert in der S3-Spezifitätstasche des  $\beta$ 5-Aktivität und offenbart einen neuartigen nichtkovalenten Bindemodus (Abbildung 1). Dabei wechselwirkt der Ligand weder mit dem Peptidbindenkanal noch mit dem Thr1O<sup>2-</sup>-Nukleophil der  $\beta$ 5-Untereinheit, von dem dieser  $8.4 \text{ \AA}$  entfernt ist. Der reversible Inhibitor passt perfekt

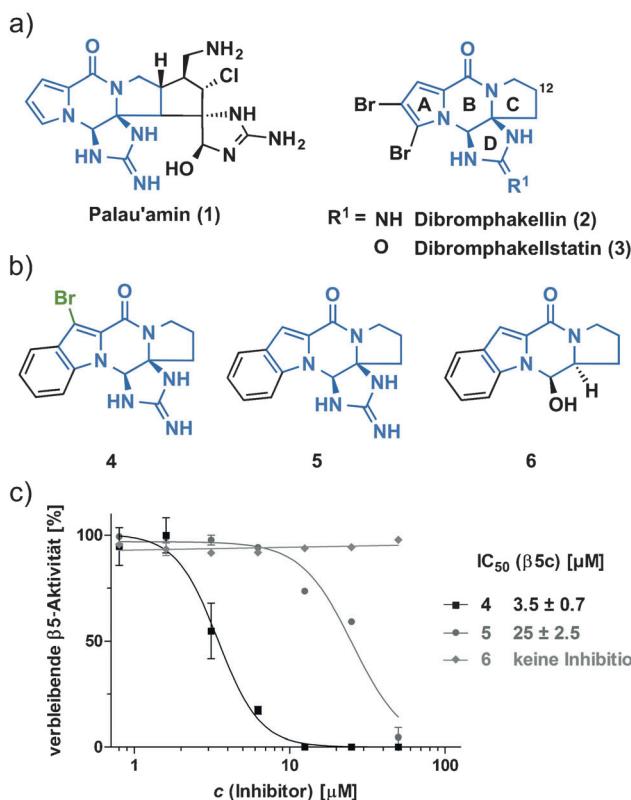
[\*] Dr. P. Beck, Prof. Dr. M. Groll

Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)  
Department für Chemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)  
E-Mail: michael.groll@tum.de

T. A. Lansdell, N. M. Hewlett, Prof. Dr. J. J. Tepe  
Department of Chemistry, Michigan State University  
East Lansing, Michigan 48823 (USA)  
E-Mail: tepe@chemistry.msu.edu

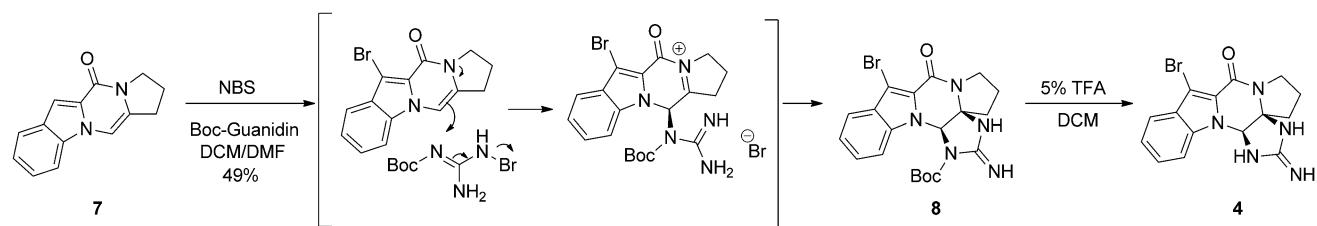
[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die DFG (GR1861/10-1) und das Europäische Forschungsrahmenprogramm (FP7/2007-2013) unter Bio-Struct-X (Nr. 283570) gefördert. Wir bedanken uns bei R. Feicht für die Aufreinigung von Hefe-20S-Proteasom sowie den Mitarbeitern der Beamline X06SA des Paul Scherrer Instituts, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für die Unterstützung bei der Datenaufnahme.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410168> zu finden.

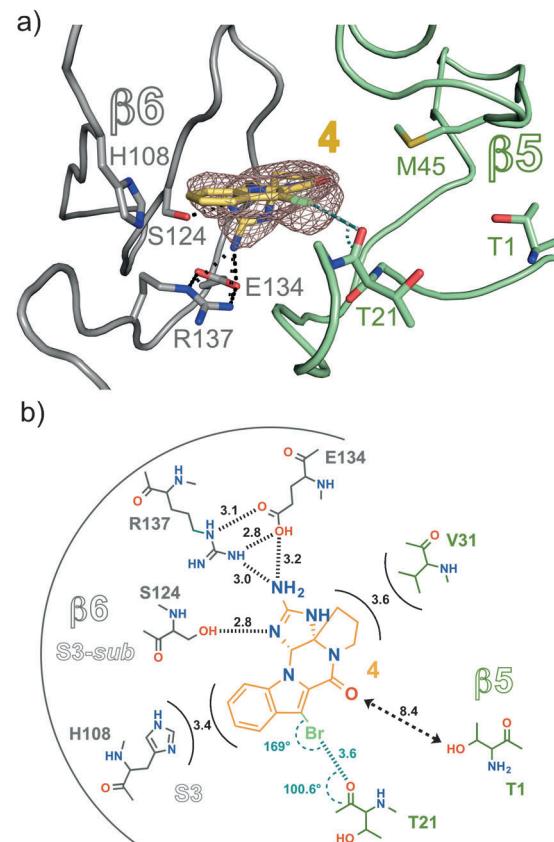


**Schema 1.** a) Der komplexe hexacyclische Naturstoff Palau'amin hat dasselbe Pyrrolimidazolin-Grundgerüst (blau) wie Phakelline und Phakellistatine, wobei der C-Ring mit zwei weiteren fünfgliedrigen Ringen substituiert ist. Dibromphakellin (2) und -phakellistatin (3) unterscheiden sich durch Amino- bzw. Oxo-Substitution am Imidazolinring. Die gewinkelte Pyrrol-Imidazol-Kernstruktur mit dem ABCD-Ringsystem ist in blau hervorgehoben. b) Synthetische Indolo-Analoga von Dibromphakellin. c) IC<sub>50</sub>-Messungen der  $\beta$ 5-Aktivität von humanem cCP nach Zugabe variierender Konzentrationen des Proteasominhibitors. Daten von drei Wiederholungen wurden auf eine mit DMSO behandelte Kontrolle normalisiert und sind als relative Aktivität mit Standardabweichung dargestellt.

zur Größe und Polarität der S3-Spezifitätstasche und koordiniert über den charakteristischen 2-Aminoimidazolin-Rest ein Netzwerk an Wasserstoffbrücken mit S124, E134 und R137 der Untereinheit  $\beta$ 6 (Abbildung 1a). Zusätzlich ist das planare tetracyclische System von **4** über Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Aminosäure-Seitenketten von  $\beta$ 6-H108 und  $\beta$ 5-V31 stabilisiert, die das Moleköl am Indol- bzw. C-Ring flankieren.



**Schema 2.** Synthese von Indolo-Phakellin **4** ausgehend von **7**.<sup>[14,15]</sup> Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.



**Abbildung 1.** Kristallstruktur von yCP im Komplex mit **4**. a)  $2F_0 - F_c$ -Elektronendichte (rotes Netz,  $1\sigma$ ) von **4** (gelb) in der S3-sub-Spezifitätstasche der  $\beta$ 5-Aktivität (grün, PDB-ID: 4RUR). b) Darstellung von (a) mit chemischen Strukturformeln. Der 2-Aminoimidazolin-Rest bildet ein Netzwerk an Wasserstoffbrücken (schwarz gestrichelt) mit den Seitenketten der Aminosäuren S124, E134 und R137 der  $\beta$ 6-Untereinheit (grau). Zusätzlich gehen  $\beta$ 6-H108 und  $\beta$ 5-V31 Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit **4** ein. Das Carbonyl-Sauerstoffatom von  $\beta$ 5-T21 stabilisiert den Liganden durch eine Halogenbrücke (turkis) mit dem Brom-Substituenten von **4** (hellgrün). Der Abstand zwischen dem Ligand und dem katalytisch aktiven  $\beta$ 5-T1 ist durch einen gestrichelten Pfeil markiert (schwarz). Abstände sind in Å angegeben.

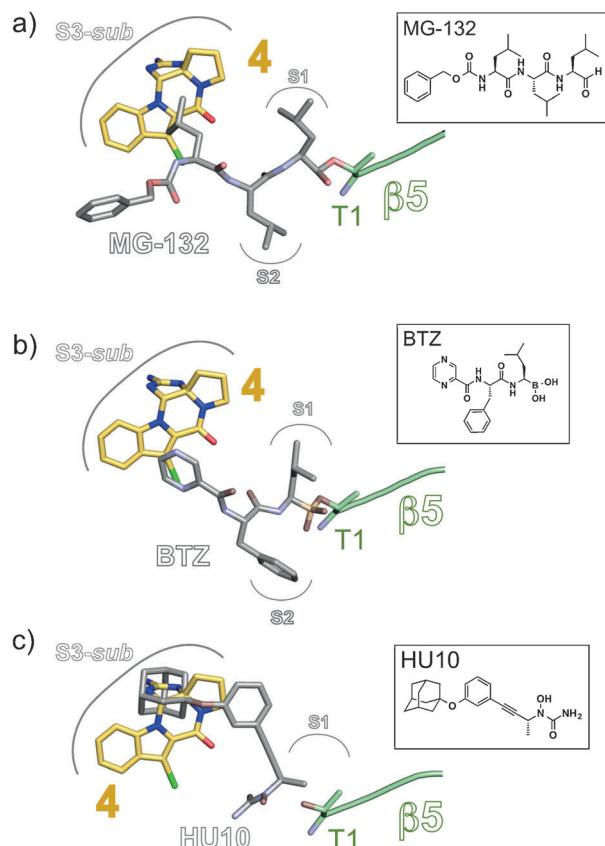
Die starre Struktur von **4** ist zudem perfekt für eine Halogenbrücke zwischen dem Brom-Substituenten und dem Carbonyl-Sauerstoffatom von  $\beta$ 5-Thr21 vororientiert. Mit einem Br···O-Abstand von 3.6 Å und annähernd kollinearer Ausrichtung der Akzeptor- und Donoratome (C-O···Br-Winkel: 169°) erfüllen die beobachteten Maße dieser 4:Thr21CO-Wechselwirkung die Anforderungen für eine

ideale Halogenbrücke.<sup>[17–19]</sup> Folglich kann die Elektronendichte des Donoratoms mit dem  $\sigma$ -Loch überlappen, das durch das unbesetzte  $\sigma^*$ -Orbital der C–Br-Bindung entsteht (siehe Abbildung 1b und S3). Der Einfluss der Halogenbrücke auf die Stabilisierung des Liganden in der Bindetasche wurde durch den Vergleich mit dem Debrom-Analog **5** untersucht (Schema 1b).<sup>[14]</sup> Obwohl **5** dasselbe Grundgerüst wie **4** hat, zeigt die Röntgenstrukturanalyse von yCP:5 keine definierte Elektronendichte für diese Verbindung. In Übereinstimmung mit den strukturellen Beobachtungen ist die Hemmwirkung von **5** auf humanes cCP ( $IC_{50}=25\text{ }\mu\text{M}$ , Schema 1c) im Vergleich zu **4** erheblich reduziert.

Um einen zytotoxischen Effekt speziell in Krebszellen zu erreichen, müssen CP-Inhibitoren die  $\beta$ -Aktivitäten sowohl des iCP als auch des cCPs blockieren.<sup>[20]</sup> Überlagerung der yCP-S3-sub-Bindetasche mit cCP- und iCP-Kristallstrukturen ergab, dass die Gesamttopologie und Polarität bei beiden Proteasomtypen gut konserviert ist (siehe Abbildung S5). Somit ist zu erwarten, dass **4** in vergleichbarer Weise an humanes iCP und cCP bindet wie in der yCP:4-Komplexstruktur. Für eine detaillierte strukturbasierte Wirkstoffentwicklung werden jedoch Kristallstrukturen des humanen CP benötigt.

Die yCP:4-Komplexstruktur zeigt weiterhin, dass der Ligand keine Wechselwirkungen mit dem Peptidbindekanal eingeht, was bisher als mechanistisches Grundprinzip von CP-Hemmstoffen angesehen wurde, die entweder ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt mit dem Protein bilden oder zumindest in die S1-Spezifitätstasche binden.<sup>[21]</sup> Das Indolo-Phakellin **4** stört die Substratbindung jedoch allein durch Blockierung der S3-Tasche. Eine Überlagerung der yCP:4-Komplexstruktur mit den entsprechenden Koordinaten von yCP gebunden mit den etablierten CP-Inhibitoren MG-132 (PDB-ID: 4NNN)<sup>[22]</sup> und BTZ (PDB-ID: 2F16)<sup>[3]</sup> veranschaulicht den einzigartigen Bindemodus im Vergleich mit peptidischen Inhibitoren (siehe Abbildung 2a,b und S4a–c).<sup>[22]</sup> Beide Liganden nutzen die S3-Spezifitätstasche nur marginal und könnten durch bessere Adressierung der großen Kavität optimiert werden. Darüber hinaus sind die hier präsentierten Daten im Einklang mit einer früheren Studie über Hydroxyharnstoffe („N-hydroxyureas, HUs) als reversible nichtkovalente CP-Inhibitoren, in der die Optimierung eines schwachen  $\beta$ -Liganden ( $IC_{50}=230\text{ }\mu\text{M}$ ) zu einem nanomolaren Inhibitor ( $IC_{50}=0.34\text{ }\mu\text{M}$ , HU10, Abbildung 2c) durch Ausnutzung der S1- und S3-sub-Spezifitätstaschen beschrieben wurde.<sup>[23]</sup> Eine Überlagerung der yCP:HU10-Komplexstruktur (PDB-ID 3SHJ)<sup>[23]</sup> mit yCP:4 zeigte zudem, dass die Position des Adamantyloxy-Rest von HU10 mit derjenigen des 2-Aminoimidazolin-Rings von **4** übereinstimmt (siehe Abbildung 2c und S4d,e). Bemerkenswerterweise führt der Verzicht der Adamantyloxy-Seitenkette zu einem kompletten Verlust der Bindeaffinität von HU10, was den erheblichen Einfluss einer P3-Seitenkette für die Stabilisierung von reversiblen Liganden im proteasomalen Substratbindekanal verdeutlicht.<sup>[23]</sup>

Frühere Studien der Arbeitsgruppe um Lindel zu synthetischen Phakellstatin-Derivaten haben gezeigt, dass das (+)-Enantiomer von Dibromphakellstatin und dessen Abkömmlinge keinen zytotoxischen Effekt auf diverse Krebszelllinien aufweisen.<sup>[24,25]</sup> Im Einklang mit dem dargelegten Bindemodus von **4** verfügt lediglich das (–)-Enantiomer über



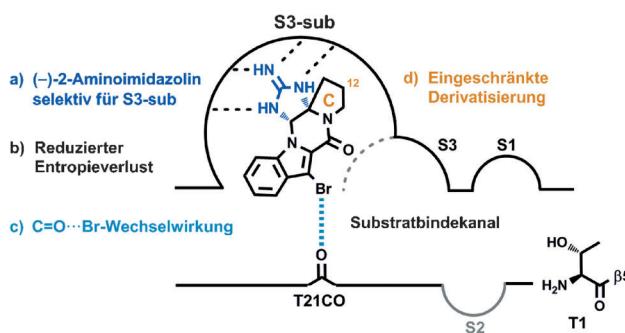
**Abbildung 2.** Überlagerung von **4** mit peptidischen und nichtpeptidischen Inhibitoren der proteasomalen  $\beta$ -Aktivität. a,b) Überlagerung von **4** (gelb) mit MG-132 (grau; PDB-ID: 4NNN)<sup>[22]</sup> oder BTZ (grau; PDB-ID: 2F16).<sup>[3]</sup> Der Bindemodus von **4** unterscheidet sich signifikant von demjenigen peptidischer Liganden. c) Der Adamantyloxy-Rest von HU10 (grau; PDB-ID: 3SHJ)<sup>[23]</sup> ist für die Inhibitorstabilisierung unentbehrlich und überlagert mit dem 2-Aminoimidazolin-Ring von **4**. Die S1-Bindetasche (grauer Bogen) ist zur allgemeinen Orientierung eingezeichnet.

Antitumoraktivität. Dieselbe Enantiospezifität wurde auch im Fall von Palau’amin beobachtet, das in der Natur nur als (–)-Enantiomer vorkommt.<sup>[26]</sup>

Ferner belegen frühere Ansätze bezüglich synthetischer C-Ring-funktionalisierter Derivate von Dibromphakellstatin, dass ausschließlich (–)-(12R)-Dibrom-12-hydroxyphakellstatin eine stärkere zytotoxische Wirkung gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien gegenüber aufweist als der Naturstoff.<sup>[25]</sup> Aus der yCP:4-Komplexstruktur ist ersichtlich, dass größere Substituenten am C-Ring mit der Proteinwand kollidieren und somit die zytotoxischen Eigenschaften erheblich reduzieren.

Dennoch bieten die hier vorgestellten Daten eine vernünftige Annäherung an die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Phakellinen und Phakellstatinen (Schema 3):

- Nur das (–)-Enantiomer hat die korrekte Konfiguration für die Bindung des 2-Aminoimidazolin-Rings in die S3-sub-Spezifitätstasche.
- Das starre kondensierte Ringsystem minimiert den Entropieverlust während einer Bindung an das Protein.



**Schema 3.** Übersicht der Strukturmerkmale von 4, die für dessen Bindeaffinität von Bedeutung sind.

- c) Die Halogenbrücke zwischen 4-Br und T21CO ist unerlässlich für die Stabilisierung des Liganden in der Bindetasche.<sup>[18]</sup>
- d) C-Ring-Derivatisierung ist nur in begrenztem Umfang möglich, da größere Substituenten mit der Proteinwand kollidieren.

Zusammenfassend bilden Indolo-Phakelline eine neue Klasse von Proteasom-Inhibitoren, die sich durch einen reversiblen Bindemodus sowie ein nichtpeptidisches Grundgerüst auszeichnen. Mit den Verbindungen gelang erstmals eine gezielte Adressierung der S3-sub-Spezifitätstasche der  $\beta 5$ -Aktivität ohne Wechselwirkung mit dem Peptidbindekanal oder der S1-Spezifitätstasche. Somit hat die yCP:4-Komplexstruktur unser Wissen über Protesominhibitoren signifikant erweitert. Sie bildet den Grundstein für die strukturbasierte Entwicklung einer neuen Generation von Hemmstoffen, die auf reaktive Kopfgruppen und peptidische Struktur motive von herkömmlichen Inhibitoren verzichtet.

Eingegangen am 16. Oktober 2014  
Online veröffentlicht am 7. Januar 2015

**Stichwörter:** Alkaloide · Halogenbrücken · Naturstoffe · Reversible Inhibition · Wirkstoffentdeckung

- [1] P. G. Richardson, T. Hidemitsu, K. C. Anderson, *Cancer Control* **2003**, *10*, 361–369.
- [2] S. D. Demo, C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlati, et al., *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6383–6391.
- [3] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ova, *Structure* **2006**, *14*, 451–456.

- [4] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238.
- [5] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S.-I. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka, *Science* **2007**, *316*, 1349–1353.
- [6] E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8838–8850.
- [7] C. Dubiella, H. Cui, M. Gersch, A. J. Brouwer, S. A. Sieber, A. Krüger, R. M. J. Liskamp, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11969–11973; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12163–12167.
- [8] L. Borissenko, M. Groll, *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 947–955.
- [9] G. de Bruin, E. M. Huber, B. Xin, E. J. van Rooden, K. Al-Ayed, K. Kim, A. F. Kisselev, C. Driessens, M. van der Stelt, G. A. van der Marel, et al., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6197–6209.
- [10] M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 58–66.
- [11] R. B. Kinnel, H. P. Gehrken, P. J. Scheuer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3376–3377.
- [12] I. B. Seiple, S. Su, I. S. Young, C. A. Lewis, J. Yamaguchi, P. S. Baran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1095–1098; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1113–1116.
- [13] I. B. Seiple, S. Su, I. S. Young, A. Nakamura, J. Yamaguchi, L. Jørgensen, R. A. Rodriguez, D. P. O'Malley, T. Gaich, M. Köck, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14710–14726.
- [14] T. A. Lansdell, N. M. Hewlett, A. P. Skoumbourdis, M. D. Fodor, I. B. Seiple, S. Su, P. S. Baran, K. S. Feldman, J. J. Tepe, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 980–985.
- [15] G. R. Pettit, J. McNulty, D. L. Herald, D. L. Doubek, J. C. Chapuis, J. M. Schmidt, L. P. Tackett, M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 180–183.
- [16] N. M. Hewlett, J. J. Tepe, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4550–4553.
- [17] P. Auffinger, F. A. Hays, E. Westhof, P. S. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16789–16794.
- [18] L. A. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 314–318; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 329–334.
- [19] R. Wilcken, M. O. Zimmermann, A. Lange, S. Zahn, F. M. Boeckler, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 935–945.
- [20] F. Parlati, S. J. Lee, M. Aujay, E. Suzuki, K. Levitsky, J. B. Lorens, D. R. Micklem, P. Ruurs, C. Sylvain, Y. Lu, et al., *Blood* **2009**, *114*, 3439–3447.
- [21] A. List, E. Zeiler, N. Gallastegui, M. Rusch, C. Hedberg, S. A. Sieber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 571–574; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 582–585.
- [22] M. L. Stein, H. Cui, P. Beck, C. Dubiella, C. Voss, A. Krüger, B. Schmidt, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1679–1683; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1705–1709.
- [23] N. Gallastegui, P. Beck, M. Arciniega, R. Huber, S. Hillebrand, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 247–249; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 251–254.
- [24] M. Zöllinger, G. Kelter, H. Fiebig, T. Lindel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 346–349.
- [25] R.-P. Moldovan, M. Zöllinger, P. G. Jones, G. Kelter, H. Fiebig, T. Lindel, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 685–698.
- [26] M. S. Buchanan, A. R. Carroll, R. J. Quinn, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4573–4574.